

## Siloxanediol coating for capillary electrophoresis and for general surface modification

Publication number: JP7507876 (T)

Publication date: 1995-08-31

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- International: B01J20/283; B01D57/02; B01J20/281; G01N27/447;  
G01N30/88; B01D57/02; B01J20/281; G01N27/447;  
G01N30/00; (IPC1-7): G01N27/447; B01D57/02; G01N30/48

- European: G01N27/447B6

Application number: JP19930515429T 19931222

Priority number(s): WO1993US12513 19931222; US19920994832 19921223

Also published as:

US5322608 (A)

AU5874194 (A)

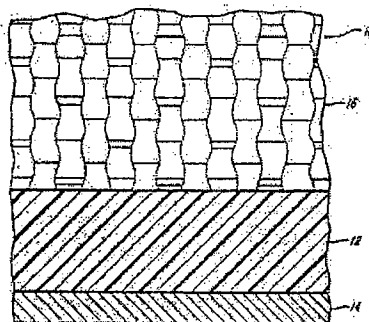
WO9415209 (A1)

EP0627079 (A1)

Abstract not available for JP 7507876 (T)

Abstract of corresponding document: US 5322608 (A)

A coated microcapillary column for high performance electrophoresis is disclosed. A preferred microcapillary includes a column; a universal sub-layer of coating material that has been highly crosslinked using a crosslinking agent and attached covalently or non-covalently to the column wall; and a variable top layer of a monomer or polymer, preferably crosslinked, attached to the sub-layer. The microcapillary preferably is prepared by covalently bonding a highly crosslinked siloxanediol sub-layer to the inner surface of the microcapillary wall and then causing a mixture of monomers or polymers to react in the bore of the microcapillary to form a top layer. The bilayer coating as used in a microcapillary prevents adsorption of solutes during electrophoresis and eliminates or controls electroosmotic flow. The disclosed coating may also be formed on other kinds of surfaces where similar surface modification is desired. The sub-layer, which can be formed from other siloxane derivatives having two nucleophilic end groups, e.g., diamino or dithiol, may be used independently, or as a base layer for bilayer or even multilayer surface formation.



Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-507876

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)8月31日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

G 0 1 N 27/447

B 0 1 D 57/02

9344-4D

G 0 1 N 30/48

Y 9407-2 J

K 9407-2 J

7363-2 J

G 0 1 N 27/ 26

3 3 1 Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平6-515429  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月22日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)8月23日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/12513  
 (87) 国際公開番号 WO94/15209  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)7月7日  
 (31) 優先権主張番号 994, 832  
 (32) 優先日 1992年12月23日  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, JP

(71) 出願人 ノースイースタン ユニバーシティ  
 アメリカ合衆国 02115 マサチューセツ  
 ツ州 ボストン ハンティングトン アベ  
 ニュー 360  
 (72) 発明者 カルガー, パーリー エル.  
 アメリカ合衆国 02159 マサチューセツ  
 ツ州 ニュートン デボラ ロード 62  
 (72) 発明者 シュマルジング, ディーター  
 アメリカ合衆国 02118 マサチューセツ  
 ツ州 ボストン ナンバー 4 トレモン  
 ト ストリート 750  
 (74) 代理人 弁理士 秋元 輝雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャピラリー電気泳動のための、および、一般的な表面変更のためのシロキサンジオールのコーティング

## (57) 【要約】

ハイパフォーマンスの電気泳動のためのコーティングされたマイクロキャピラリーカラム。好ましいマイクロキャピラリーは、カラム；架橋剤を用いて高度にクロスリンクされ、かつ、カラムの壁に共有付着または非共有付着されているコーティングマテリアルのユニバーサルなサブレイヤー；および好ましくは、クロスリンクされていて、サブレイヤーに付着されているモノマーまたはポリマーの変換トップレイヤーを含む。該マイクロキャピラリーは、高度にクロスリンクされたシロキサンジオールのサブレイヤーをマイクロキャピラリーの壁に共有結合され、そして、モノマーまたはポリマーの混合体をマイクロキャピラリーのボア内で反応させてトップレイヤーを形成させることによって作られることが好ましい。マイクロキャピラリーに使用されるものとしての複層コーティングは、電気泳動の間、溶質の吸着を防ぎ、電気浸透フローをなくし、または、コントロールする。例えば、ジアミノまたはジチオールのような二つの求核末端基をもつ他のシロキサン誘導体から作ることができ、るサブレイヤーは、独立して使用できるし、または、複

層のベース層として、または、イーブンのマルチレイヤー・サーフェイス・フォーメーションとして使用できる。

## 特表平7-507876 (2)

請求の範囲：

1. 高精度で高いパフォーマンスの電気泳動のためのマイクロキャピラリーカラムで、以下の構成からなるもの：  
内部キャピティと内面をもつ壁とを有するマイクロキャピラリー；  
クロスリンキング剤と高度にクロスリンクされ、前記壁の前記内面に共有付着または非共有付着されたシロキサンジオール・ポリメリック・コーティングマテリアルのサブレイヤー；および  
前記サブレイヤー・コーティングマテリアルに共有付着または非共有付着されたコーティングマテリアルのトップレイヤー。
2. 前記マイクロキャピラリーが溶融シリカで作られている請求の範囲1のマイクロキャピラリーカラム。
3. コーティングマテリアルの前記トップレイヤーがクロスリンクされている請求の範囲1のマイクロキャピラリーカラム。
4. 前記サブレイヤー・コーティングマテリアルがポリメチルビニルシロキサンジオールである請求の範囲1のマイクロキャピラリーカラム。
5. コーティングマテリアルの前記トップレイヤーは、クロスリンクされていないポリアクリルアミドからなる請求の範囲1のマイクロキャピラリーカラム。
6. コーティングマテリアルの前記トップレイヤーは、クロスリンクされたポリアクリルアミドからなる請求の範囲1のマイクロキャピラリーカラム。
7. コーティングマテリアルの前記トップレイヤーは、ポリメチロールアクリルアミドからなる請求の範囲1のマイクロキャピラリーカラム。
14. 前記の付着工程において、シロキサン誘導体は、シロキサンジオールである請求の範囲11の方法。
15. 前記の付着工程は、前記のクロスリンキング工程に先立って行われる請求の範囲11の方法。
16. 前記クロスリンキング工程において、前記架橋剤は、前記ポリマー・コーティングマテリアルからセパレートのものである請求の範囲11の方法。
17. 前記架橋剤は、前記クロスリンキング工程に先立つパーシャルのクロスリンキング工程における前記ポリマー・コーティングマテリアルの個々のポリマーに予め付着されている請求の範囲11の方法。
18. 前記ポリマー・コーティングマテリアルは、複数の非求核付着センターを備える請求の範囲11の方法。
19. 前記非求核付着センターは、ビニル基からなる請求の範囲18の方法。
20. 前記非求核付着センターは、アルキル基からなる請求の範囲18の方法。
21. 前記面に付着の前記層は、サブレイヤーであって、前記方法は、さらに、前記コーティングの第2の層の分子を前記ポリマー・コーティングマテリアルの前記複数の非求核付着センターに付着させる工程を含む請求の範囲18の方法。
22. 前記第2の層のための前記分子がそれら自身クロスリンクされている請求の範囲21の方法。

8. 高精度で高いパフォーマンスの電気泳動のためのマイクロキャピラリーカラムで、以下の構成からなるもの：  
内部キャピティと内面をもつ壁とを有する溶融シリカのマイクロキャピラリー；  
前記壁の前記内面に共有結合され、高度にクロスリンクされたポリメチルビニルシロキサンジオールであるコーティングマテリアルのサブレイヤー；および  
前記コーティングマテリアルのサブレイヤーに共有結合されているポリアクリルアミドからなるトップレイヤー。
9. 前記ポリアクリルアミドがクロスリンクされたポリアクリルアミドである請求の範囲8のマイクロキャピラリーカラム。
10. 前記ポリアクリルアミドがポリメチロールアクリルアミドである請求の範囲8のマイクロキャピラリーカラム。
11. 下記の工程からなる面にコーティングを形成する方法：  
コーティング付着の面を準備する；  
二つの求核末端基をもつシロキサン誘導体からなるポリマー・コーティングマテリアルの層を前記面に付着する；および  
前記ポリマー・コーティングマテリアルの個々のポリマーを架橋剤を用いてクロスリンクさせること。
12. 前記の付着工程において、前記のポリマー・コーティングマテリアルの層が前記の面に共有結合されている請求の範囲11の方法。
13. 前記の付着工程において、前記のポリマー・コーティングマテリアルの層が前記の面に非共有的に関連されている請求の範囲11の方法。
23. 前記第2の層のための前記分子が前記第2の層のための前記分子を付着する前記工程の後にクロスリンクされる請求の範囲22の方法。
24. 前記ポリマー・コーティングマテリアルは、ポリメチルビニルシロキサンジオールである請求の範囲21の方法。
25. 前記コーティングの第2の層のための前記の分子は、ポリアクリルアミドである請求の範囲21の方法。
26. 第2の層のための分子を付着させる工程において、第2の層のための前記の分子は、前記ポリメチルビニルシロキサンジオールのビニル基と共有的に反応する請求の範囲24の方法。
27. 第2の層のための分子を付着させる工程において、第2の層のための前記の分子は、前記ポリメチルビニルシロキサンジオールと非共有的に結合する請求の範囲24の方法。
28. 下記の工程からなる、面に複層コーティングを形成する方法：  
コーティング付着の面を準備すること；  
シロキサンジオール・ポリマー・コーティングマテリアルの副層を前記面に付着すること；  
架橋剤を用いて個々のシロキサンジオール・ポリマーをクロスリンクさせること；および  
前記複層コーティングのトップ層のための分子を前記クロスリンクされたシロキサンジオール・ポリマー・コーティングマテリアルの非求核付着センターへ付着させること。
29. 下記を備える、面ヘマレレイヤー・コーティング：

## 明細書

名称 キャピラリー電気泳動のための、および、一般的な  
表面塗布のためのシロキサンジオールのコーティング

## 発明の分野

この発明は、表面用のコーティング、そして、特に詳しくは、キャピラリー電気泳動カラムに適したコーティングに関するものである。

## 発明の背景

キャピラリー電気泳動分離技術は、生化学関連のサイエンスにおいて広い応用範囲があるものである。ペプチド、プロテイン、オリゴ核酸およびオリゴ糖類のような分子種は、電界の影響下でバッファー溶液中を移動させることで分離される。この分離は、電気泳動分離中に、ゾーンの崩壊を生じさせる熱の放出をなくすために、薄い壁で細いボアのキャピラリーチューブ内で行われるのが通常である。

とりわけゾーンのくずれを生じさせるメカニズムは、不均一な電気浸透と、分離すべき物質がキャピラリーの内面に吸着してしまうことである。しかしながら、吸着と不均一な電気浸透は、電気泳動チューブの内壁に各種のポリマー物質をコーティングすることで解決できる。

米国特許第4, 680, 201号において、ヒェルタン (Hjertan) は、細いボアのキャピラリーの内壁に、例えば、 $\gamma$ -メタクリルオキシプロピルトリメトキシシランのような二官能試薬の手段によってキャピラリーの内壁に結合されるポリアクリルアミドのモノモルキュラー・ポリマー・コーティングを施す方法を記載している。これらのキャピラリーは、オープンチューブにおけるフリーゾーン電気泳動に使用できる。

ノボトニエ他の米国特許第5, 074, 982号は、電気泳動分離に使用されるシリカキャピラリーの内壁が加水分解安定性のため、グリニヤール試薬を用いる二官能試薬でコーティングできることを記載している。

ホロウエイの米国特許第5, 110, 438号は、ポリアクリルアミ

ド・ゲル電気泳動カラムを示し、これは、溶解シリカチューブ、ポリアクリルアミド・ゲル・マトリックスおよび該チューブと該ゲルマトリックスとの間でラジアルにクロスリンクされており、そして、該チューブと該ゲルマトリックスとの両者に共有付着しているポリデメチルシロキサンの鎖を有している。

フアング他 (J. Micro. Spens. 4:135-143, 1992) は、マイクロキャピラリーチューブの面にポリエチレン・グリコールおよびポリエチレン・イミンを結合する手順をレポートしている。該キャピラリーの面は、まず最初、シリコン水素化合物ポリマーの結合のためのシラノール基の均一で、濃厚な分布を作るように処理される。例えば、250° C のような昇温された温度で、ポリマー・ミクスチャーにおける Si-H 基はキャピラリーの面でシラノール基と反応し、Si-H 基交差結合ポリマー鎖を残す。Si-H 基を介しての遊離基反応がさらにポリマー鎖をクロスリンクさせる。

## 発明の概要

本発明は、キャピラリー電気泳動カラムにおいて見出されるような面に適したコーティングを大まかな特徴とする。該コーティングは、ユニバーサルで、高度にクロスリンクされたサブレイヤーで、この上に可変のトップレイヤーまたは複数の層がアタッチされる副層を含む。発明のコーティングの副層 (sub-layer) は、概略的には、二つの求核末端基 (例えば、シロキサンジオール) と交差結合試薬を用いるコーティングマトリアルをクロスリンク・インディビジュアル・ポリマー類とを有するシロキサン誘導体からなるポリマー・コーティングマトリアルを所望の面に付着させることによって形成されるものである。クロスリンクの工程は、付着工程の前あるいは後でも行え、前記面とポリマー・コーティングマトリアルとの間の付着は、電子対共有か、または、電子対共有のものではないのいずれでもよい。好ましいコーティングマトリアルは、ポリメチルビニルシロキサンジオールである。

ポリマー・コーティングマトリアルが、前記コーティングの第2の層を電子対共有的に、または、非電子対共有的に更に付着するサイトになる多数の非求核付着センターを含むことが好ましい。第2の層のポリマーは、これもまた、

クロスリンクされる。好ましい第2の層のコーティングマトリアルは、ポリアクリルアミドであり、これは、アミノ基を介してフォルムアルデヒドとクロスリンクされる。

発明の好ましいマイクロキャピラリーカラムは、内部キャピティと内面をもつ壁；交差結合剤で高度にクロスリンクされ、前記壁の内面に電子対共有的に、または、非電子対共有的に付着されたシロキサンジオール・ポリマー・コーティングマトリアルを有する。好ましい第2の層のコーティングマトリアルは、電子対共有的に、または、非電子対共有的に付着されたクロスリンクされた、または、クロスリンクされていないコーティングマトリアルを有するマイクロキャピラリーを含む。

発明のコーティングは、新しい安定した面 (サーフェース) を作り、広範な pH 範囲にわたり、該コーティングを安定させ、必要に応じて、トップレイヤーまたはトップの複数の層のグラフトングおよび/または吸着を高効率化させる。キャピラリー電気泳動に使用されているように、前記コーティングは、電気浸透フローを抑制し、または、コントロールし、カラム表面への分析物の吸着を防ぐ。

フリーラジカルフォーメーションの既知の方法の代わりに、前記コーティングを安定させるためにクロスリンク剤を使用することは、クロスリンク反応が室温で行えることを意味する。これによって、非求核付着センターとしてのポリマー・コーティングマトリアルと組める基のタイプと数の範囲が広がる。フリーラジカルクロスリンクの間の、より高い温度においては、例えば、ビニル基、エポキシ基などの多数の好ましい基が死滅する。したがって、発明のコーティングがマルチレイヤー構成のサブレイヤーとして作用するとき、他のマトリアルの場合に比べて、より濃厚な第2の層が形成される。前記コーティングの重合、クロスリンクそしてモディフィケーションのための化学反応は、極めて簡単に、パラエティに富んだ特性と用途が得られる。

## 図面の簡潔な記述

発明の他の特徴と利点は、添付の図面に関連しての好ましい実施例の

下記の記述から明らかになるもので、図面において：

図1は、発明の一実施例のコーティングされたマイクロキャピラリー・カラムの断面図を示し；

図2は、シロキサジオールを合成するための酸または塩基の開環を示し；

図3は、室温における、クロスリンク剤を用いてのシロキサジオール・ポリマーのクロスリンクを示し；

図4は、発明のシロキサジオールのサブレイヤー・コーティングのフリービニル基へアクリルアミド・ポリマーをグラフトする状態を示し；

図5は、発明のマイクロキャピラリーカラムを用いた、pH 4.4における塩基性プロテインのオープンチューブキャピラリーゾーン電気泳動を示し；

図6は、発明のマイクロキャピラリーカラムを用いた、pH 8.8における酸性プロテインのオープンチューブキャピラリーゾーン電気泳動を示し；

図7は、発明のマイクロキャピラリーカラムを用いた、プロテインのSDSポリマーネットワーク分離を示し；

図8は、発明のマイクロキャピラリーカラムを用いた、DNAのポリマーネットワーク分離を示し；そして、

図9は、発明のマイクロキャピラリーカラムを用いた、DNA反応プロダクトのポリマーネットワーク分離を示す。

#### 発明の詳細な記述

キャピラリー電気泳動に実施される発明は、分離キャピラリーの内面への高度にクロスリンクされたコーティングを提供する。図1に示すように、発明のマイクロキャピラリーカラムは、マイクロキャピラリー10；例えば、シロキサジオールのような二つの求核末端基を有するシロキサジオリシ体のサブレイヤーで、マイクロキャピラリーの内面14に電子対共有的または非電子対共有的に付着され、クロスリンク剤を用いて、フリーラジカルフェーメーションではなく、好ましくは室温で、広範囲にクロスリンクされたサブレイヤー12；お

このようにして作られたシロキサジオリシ体は、アルキルトリアセトキシシランのようなクロスリンカーと共に無水エーテルのような無水溶剤に適当なレシオ（例えば、20：1，w/v）で溶解される（図3）。二つのコンポーネントは、ついで、“スタティック”方法を用いて、電気泳動カラム（例えば、溶融シリカのもの）の内面に施されるもので、該方法においては、前記カラムには、該溶液が満たされ、一端を閉止し、他端からヴァキュームをかける。溶剤蒸発後、付着した皮膜は、約24時間に亘って、大気中の湿気にさらされ、クロスリンクおよび共有結合される。また別の手段としては、例えば、アシロキシシロキサジオリシ体のような単一コンポーネントシステムを用いることもできる。このコンパウンドは、同じ分子内にシロキサジオリシ体・ポリマーとクロスリンカーを含む。ついで、湿気にさらして、クロスリンク工程が部分的に開始される。

スターティングのシロキサジオリシ体・ポリマーのジオール末端基のみがサブレイヤー・クロスリンク・プロセスに関連するので、サブレイヤー・マトリックスの内面ビニル側鎖がトップレイヤーの付着に完全に利用される。このような付着を行うには、クロスリンクされたポリメチルビニルシロキサジオリシ体でコーティングされたカラムにアクリルアミド、 $N,N,N',N'$ -テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）および過硫酸アンモニウムの溶液を充填する。アクリルアミド分子は、重合し、図4に示すように、遊離ビニル基と反応してシロキサジオリシ体の面にグラフトされる。約12時間の後、グラフトされないポリアクリルアミドは、注射器で追い出される。

シロキサジオリシ体・ポリアクリルアミドの皮膜をさらに安定化させるために、該カラムにpHを10に調節したフォルムアルデヒドの水溶液を充填する。ハント他の米国特許第3,214,420号に示されているように、前記フォルムアルデヒドは、アクリルアミドの内面のアミド基と反応して、メチロールアクリルアミドを形成し、これは、強くクロスリンクして、ポリメチロールアクリルアミドまたはトップレイヤー16を形成する（図1）。約3時間の後、フォルムアルデヒド溶液は、注射器で追い出され、前記カラムは、使用準備完了になる。この二工程クロスリンク・プロセスは、例えば、ビスアクリルアミドを

よびクロスリンクされたシロキサジオリシ体層の多数のインターナル非求核センターへ付着（電子対共有的または非電子対共有的に）できる分子のトップコーティングレイヤー18を含む。

マイクロキャピラリーは、電気泳動に使用される検知システムが使用される特定のマテリアルと適当に機能することができるものであれば、多種類のマテリアルから作ることができる。適当なマテリアルは、溶融シリカ、ガラス、アルミナ、ベリリアおよびテフロン（商標）を含む。マイクロキャピラリーは、溶融シリカで作られることが好ましい。

第1の内面コーティング層（サブレイヤー12）は、分離カラムの内面に電子対共有付着された高度にクロスリンクされたポリメチルビニルシロキサジオリシ体からなるのが好ましい。このシロキサジオリシ体のベース層は、コーティングにpH安定性を与え、その二重結合を介して、濃厚な最終のトップレイヤーにグラフトまたは吸着するプラットフォームを提供する。トップレイヤー18は、シロキサジオリシ体にグラフトされた高度にクロスリンクされたポリメチロールアクリルアミドからなるのが好ましい。ポリメチロールアクリルアミドのトップレイヤーは、電気浸透フローを抑制またはコントロールするものであり、前記カラムの面に分析物が吸着されるのを防ぐ。さらに、前記コーティングは、広いpH範囲にわたり安定性を確保し、高度の実験再現性を与える。前記カラムは、高い電界においての数百回にわたる使用に耐えることができる。

サブレイヤー12の調製に使用されるシロキサジオリシ体は、確立された工程により、1,3,5,7-テトラビニルテトラメチルシクロテトラシロキサジオリシ体から酸性触媒または塩基性触媒によって合成されるものである（例えば、ジェイ、ダブリュ、ディーン、“シリコン・アドヘンシブ・シーランツ・アンド・アドヘンシブズ”、アービング・スケイスド、*ハンドブック・オブ・アドヘンシブズ*、ニューヨーク：ヴァン・ノストラッド、ラインホルド（1990）参照）。図2を参照すると、1,3,5,7-テトラビニルテトラメチルシクロテトラシロキサジオリシ体が開環され、縮合反応されて、シロキサジオリシ体の長いポリマーが作られる。シロキサジオリシ体の分子量は、1,3,5,7-テトラビニルテトラメチルシクロテトラシロキサジオリシ体の酸または塩基それぞれのレシオによってコントロールされる。

使用したり、または、キャピラリー内でメチロールアクリルアミドを直接重合して、ポリアクリルアミド分子をクロスリンクするスタンダードな工程方法よりも簡単にコントロールされるものである。多量の他のマテリアル（例えば、実施例Bに示されるようなもの）もクロスリンクされたシロキサジオリシ体・サブレイヤーに同じようにして付着される。さらに、ファイナルなトップレイヤーを電気対共有付着の代わりに、吸着によってサブレイヤーにグラフトできる。とりわけ吸着されるコンポーネントは、ポリエチレングリコール（PEG）、セルロース誘導体、デキストランまたはポリビニルアルコールである。

発明のコーティングは、ガスクロマトグラフィ、HPLCおよび超音速液体クロマトグラフィにおける不動相固定相として、使用されることもできる。この用途のためには、シロキサジオリシ体層（クロマトグラフィのサポートに高度にクロスリンクされ、電子対共有付着されたもの）がそれ自体相互に作用する面として機能する。原理的には、疎水性または親水性のシロキサジオリシ体を使用してサーフェースのレイヤーを形成する。例えば、逆相クロマトグラフィには、ポリアルキルシロキサジオリシ体を使用できるものである。アルキル基のタイプとレシオを変えることで、異なったクロマトグラフ選択性を得ることができる。特定の選択性は、特別の選別子（例えば、キラルセクター）をシロキサジオリシ体層に結合することによってイントロデュースされることである。

高度にクロスリンクされたポリメチルビニルシロキサジオリシ体は、ほとんどどのようなマテリアルの上に平滑でしっとりしたフィルムを形成するから、そして、その二重結合が広い範囲にわたるモノマーとポリマーとに異なる特性をグラフトさせるから、発明のコーティングは、試料マテリアルの吸着を防ぐことが必要であるすべての分野に亘って使用されるものである。これらの用途としては、例えば、ガラスプレート、試料容器、スチレンスチールのジョイント、ビペット先端、エレクトロスプレッド・マス分光器チップなどのコーティングである。

シロキサジオリシ体のサブユニットを重合する化学反応は、極めて簡単に進行する。したがって、サブレイヤーの多数の付随的なモディフィケーションもまた発明の範囲内にある。例えば、求核末端基のいずれか（例えば、ジアミノ

またはジチオール)をもつシロキサンポリマーは、シロキサンジオール形成の反応条件を要えることで作ることができる。これらのポリマーは、アルキルトリアセトキシシランまたは各種の適当なクロスリンカー(例えば、メチルトリメトキシシラン、メチル・トリス(メチルエチルケトキシイミノ)シラン、メチルトリス(シクロヘキシルアミノ)シラン、メチルトリス(N-メチルアセトアミド)シラン、テトラエトキシシランなど)と同じようにクロスリンクできるものである。さらに、クロスリンクされたシロキサンジオール層は、第2のコーティングの付着のために、各種パラエティに富んだ基を含むことができる。上記したビニル反応性センターのほかに、適当な反応性または相互作用の基は、限定されるものではないが、アルキル、アリル、オレフィン、カルボニルまたは非求核エイジェントを含むものである。さらに、付加的コーティング層の取り付けのサイトは、ポリマーの混合体により提供されるものである。

#### 実施例

A) ポリメチルビニルシロキサンジオールは、塩基性触媒(実施例I)および酸性触媒(実施例II)により合成できる(図2)。

#### 実施例 I

25mlの1,3,5,7-テトラビニルテトラメチルシクロテトラシロキサンと0.1447gのパウダー状のNaOHを140°Cに加熱する。3時間後、粘稠性の混合体をエーテルに溶解し、水洗して中性にする。エーテル溶液は、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の上で乾燥され、溶剤が蒸発した。黄色みを帯びたポリメチルビニルシロキサンジオールは、粘度約71ポイズを有するものである。

#### 実施例 II

25mlの1,3,5,7-テトラビニルテトラメチルシクロテトラシロキサンと8.9mlの濃縮H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>とを25mlの無水エーテルに溶解する。3日の後、室温で攪拌し、粘稠性の混合物を水洗して中性にする。エーテル溶液は、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の上で乾燥され、溶剤が蒸発した。無色のポリメチルビニルシロキサンジオー

注射器により直ちにシロキサンジオールをコーティングしたカラムへ注入する。12時間の後、重合されているが、グラフトされていないアクリルアミドが追い出される。該カラムは、使用準備完了である。

#### 実施例 V

1mlの水に400mgのビニルピロリドン溶液(40%モノマー)を30分間、ヘリウムを介してのパブリングにより脱ガスする。pHを水酸化アンモニウム(40%)で10に調節し、7μlのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%)を添加する。該混合物を注射器によりシロキサンジオールがコーティングされたカラムへ注入する。50°C、30分後、該カラムを50μlの水でリンスする。該カラムは、使用準備完了である。

#### 実施例 VI

1mlの水に40mgのN-アクリロイルトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(NAT)の溶液(40%モノマー)を30分間、ヘリウムを介してのパブリングにより脱ガスする。3μlのTEMED(水に10重量%)および3μlのAPS(水に10重量%)を添加する。該混合物を注射器により直ちにシロキサンジオールをコーティングしたカラムへ注入する。12時間の後、重合されているが、グラフトされていないNATが追い出される。該カラムは、使用準備完了である。

#### 実施例 VII

実施例IVのポリアクリルアミド・カラムにNaOHでpHを10に調節したフォルムアルデヒドの3.7%溶液を充填する。3時間後、該溶液を50μlの水でリンスする。該カラムは、使用準備完了である。

C) ポリメチルビニルシロキサンジオールのサブレイヤー皮膜を形成した後、ビニル基二重結合は、また、エポキシ基(実施例VII)またはジオール基(実施例IX)へコンパートできる。酸性触媒、塩基性触媒または加熱処理により、エポキシ基は、求核ポリマー

ルは、粘度約75ポイズを有するものである。

B) 高度にクロスリンクされたシロキサンジオールコーティングは、実施例IIIに示されているようなスタティックな方法により施すことができる。周囲温度で夜通し、キャピラリーの面にシロキサンジオールをクロスリンクさせ、結合させた後(図3)、アクリルアミド(実施例IV)、ビニル・ピロリドン(実施例V)またはN-アクリロイルトリス

(ヒドロキシメチル基)アミノエタン(NAT)(実施例VI)のいずれかをポリマーサブレイヤーにグラフトする。グラフトされたポリアクリルアミドは、さらに、フォルムアルデヒドでポリメチロールアクリルアミドへコンパートでき、これは、それ自身と自動的にクロスリンクする(実施例VII)。使用できる他のモノマーは、例えば、ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、酢酸ビニル、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、N-メタクリロイルトリス(ヒドロキシメチル)-アミノエタン、N-メチルアクリルアミド、N-ジメチルアクリルアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、ジアリルジメチルアンモニウムクロライドである。

#### 実施例 III

50mgのポリメチルビニルシロキサンジオールと3μlのビニルトリアセトキシシランとを4.8mlの無水エーテルに溶解する。該混合物を注射器によって溶融シリカカラム(内径=75μm、長さ=70cm)へ充填する。該カラムの一端を隔壁で閉止し、他端にヴァキュウムをかける。溶剤が完全に蒸発した後、該隔壁を除去し、該カラムを24時間にわたり、空気中の湿気にさらす。皮膜の厚さは、約0.2μmである。

#### 実施例 IV

1mlの水に50mgのアクリルアミドの溶液(5%モノマー)を30分間、ヘリウムを介してのパブリングにより脱ガスする。10μlのTEMED(水に10重量%)および10μlのAPS(水に10重量%)を添加する。該混合物を

(例えば、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミンまたはポリビニルアルコール)と反応できることになる(実施例VIII)。Ce(IV)の存在下、ジオール基を使用して、ビニルモノマー(アクリルアミド、酢酸ビニル、ビニル・ピロリドンなど)をシロキサンジオール・コアへグラフトさせ、重合させる(実施例IX)。さらに、チャージされた基をビニル基二重結合を介してサブレイヤーに添加すれば、それらは、電界を作用させたとき、電気浸透フローをエスタブリッシュするのに役立つ。(実施例X、XI)。これらのチャージされた基は、適当に選択されたトップレイヤー、例えば、ポリエーテルによってスクリーンされることができ、この結果、移動する溶質イオンは、静電的に吸着されることはない。

#### 実施例 VIII

カラムに1mlのエーテルにクロロ過安息香酸0.4g(50~60%)の溶液をオーバーナイトで充填した。翌日、該カラムに1mlのジオキサンに0.2gのPEG、30μlのBF<sub>3</sub>の溶液を充填した。100°C、1時間後、該カラムをメタノールで、ついで、水でリンスした。

#### 実施例 IX

カラムに0.5mlの水、0.2mlのアセトン、24mg(0.08mmol)のOsO<sub>4</sub>および0.182g(1.08mM)のN-メチルモルフォリン-N-オキサイド。2H<sub>2</sub>Oの溶液を充填した。24時間後、該カラムを水洗し、0.5gのアクリルアミド、10mlの水、1Mの硝酸に0.1Mの4価のセリウムを含む硫酸アンモニウム0.25mlの溶液を充填した。12時間後、該カラムを水でリンスした。

#### 実施例 X

1mlの水におけるマイナスチャージの2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸40mgをヘリウムを介してのパブリングにより脱ガスする。5μ

1のTEMED (10重量%)と5μlのAPS (10重量%)を添加する。シランジオールをコーティングしたカラムに該溶液が直ちに充填され、12時間後、該溶液を追い出し、該カラムは、使用準備完了となる。ネガティブにチャージされたコーティングは、カソードに対し強いeof「Electroosmotic flow, Towns and Regnier, Anal. Chem. Vol. 64:2473-2478 (1992年)による」を作る。

#### 実施例 XI

1mlの水におけるプラスチャージのジアリルジメチル塩化アンモニウムの320mgをヘリウムを介してのバブリングにより脱ガスする。20μlのTEMED (10重量%)と20μlのAPS (10重量%)を添加する。シランジオールをコーティングしたカラムに該溶液が直ちに充填され、12時間後、該溶液を追い出し、該カラムは、使用準備完了となる。ポジティブにチャージされたコーティングは、アノードに対し強いeofを作る。

D) 発明の複層コーティングは、プロテインのオープンチューブCZE分離 (実施例XII、XIII)に、プロテインのSDSゲル分離 (実施例XIV)に、DNAのゲル分離 (実施例XV)に、DNAシーケンシング分離 (実施例XVI)に成功裡に使用されている。他の用途も除外されるべきものではない。

#### 実施例 XII

(図5)。試料: (1) リゾチーム、(2) シクロクロムc、(3) リボヌクレアゼ、(4) ミオグロビン、(5) トリプシンノゲン。コーティング: 実施例IX。  
条件: 全長L=56cm、注入端部から検知器への長さl=28cm、内径=75μm検知: 紫外線214nm、15kV、7μA; バッファー: 20mM L-アミノカプロン酸 (pH 4.4)。

#### 実施例 XIII

l=18cm、内径=75μm。エレクトロフロログラム (通電クロマトグラム) の断面が示されている。分離マトリックス: 100%TEMEDの0.5μlおよび10%APSの1.0μlで重合された8%Tアクリルアミド。電界: 250V/cm。  
分離温度: 24°C。界面導電インジェクション: 7秒。  
ゲルバッファー: 1 X TBE+30% (v/v) フォルムアミド+3.5M 尿素。

E) 他の実施例においては、トップレイヤーは、吸着性コーティングにより施すことができる。

#### 実施例 XVII

シロキサンをコーティングしたカラムにセルロースの1%水溶液 (高粘稠性) を充填する。12時間後、該溶液を追い出し、使用準備完了となる。セルロースの代わりに、0.5%PVA124 000水溶液が同じ用途に使用できる。

発明の他の実施例は、本明細書を考慮し、または、ここに記載された発明のブラクティスから当業者に明らかである。以下の請求の範囲に示された発明の真の範囲とスピリットで、明細書と実施例は、例示的のみとしてみなされるべきであることが意図されている。

(図6)。試料: (1) グルコース-6- 磷酸脱水素酵素、(2) トリプシン・インヒビタ、(3) β-ラクトグロブリン A、(4) L-アスパラギナーゼ、(5) αラクトalbumin。コーティング: 実施例IV。

条件: バッファー: 20mM TAPS (pH 8.8) 以外は、実施例XIIと同じである。

#### 実施例 XIV

(図7)。試料: 還元されたプロテイン- SDS 錯体、(1) ミオグロビン、(2) 炭酸脱水素、(3) オパールブミン、(4) 牛血清蛋白、(5) 加糖酸分解酵素 B。

コーティング: 実施例V。

条件: 全長L=25cm、注入端部から検知器への長さl=18cm、内径=75μm定電流30μA 25分間、8.5kV; 70mMアミノ-メチルプロパンジオール、0.6% SDS/TES (pH 8.1) に溶解されたバッファーおよびポリマー・ネットワーク10% (w/v) デキストラン (MW 2,000, 000)。

#### 実施例 XV

(図8)。試料: DNA φX174-HaeIII。コーティング: 実施例IV。

条件: 全長L=58cm、注入端部から検知器への長さl=30cm、内径=75μm検知: 紫外線260μm; 300V/cm、13μA; バッファーおよびポリマー・ネットワーク3%ポリアクリルアミド。

#### 実施例 XVI

(図9)。試料: FAM-ラベルされたM13 (-21) プライマーズ (ABI)、(A>G)-を用いるM13mp18シングル・ストランドのファージDNAの連鎖。

コーティング: 実施例IV。全長L=33cm、注入端部から検知器への長さ

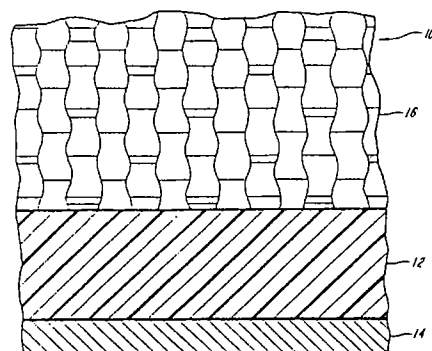


FIG. 1

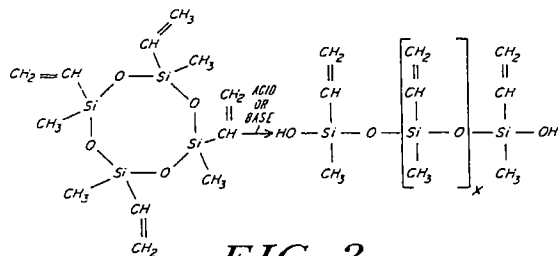
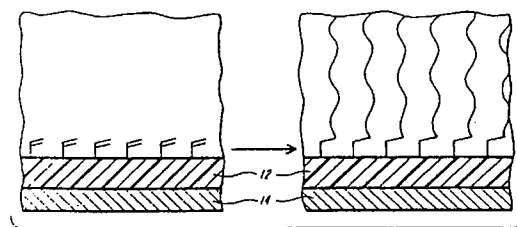
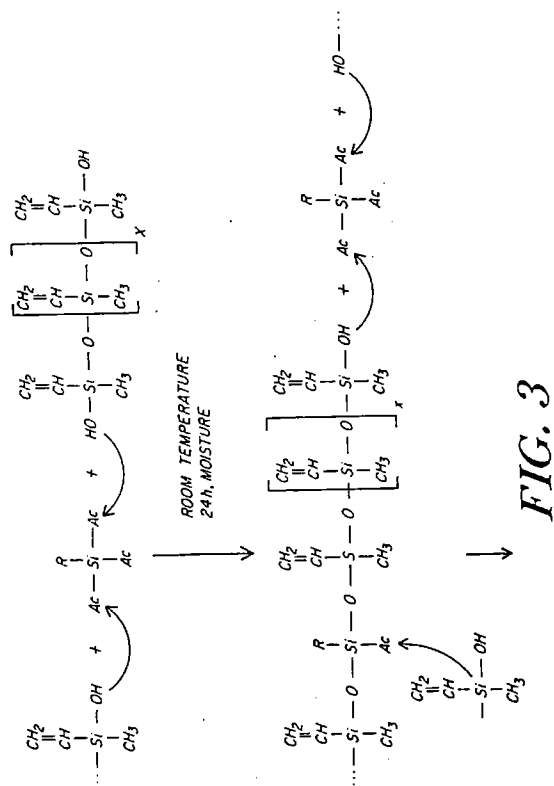
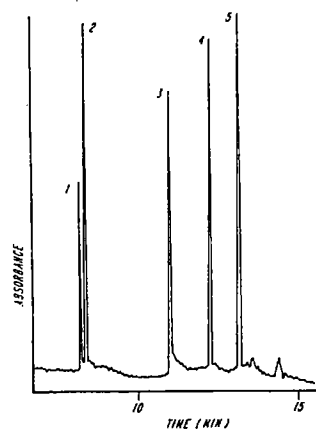


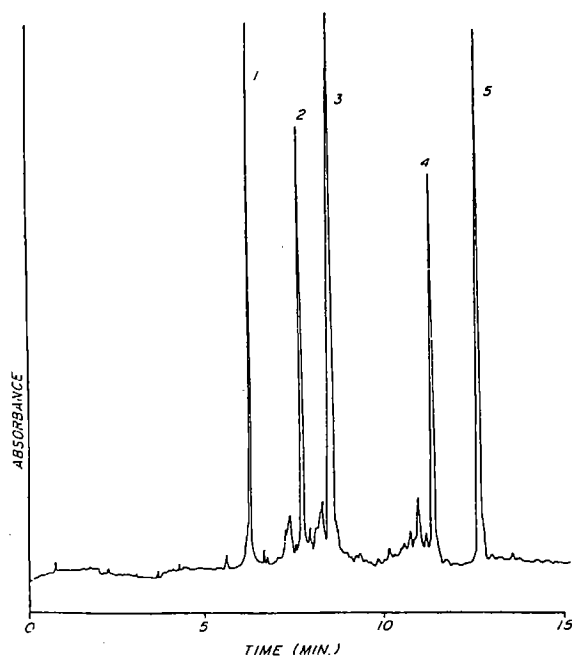
FIG. 2



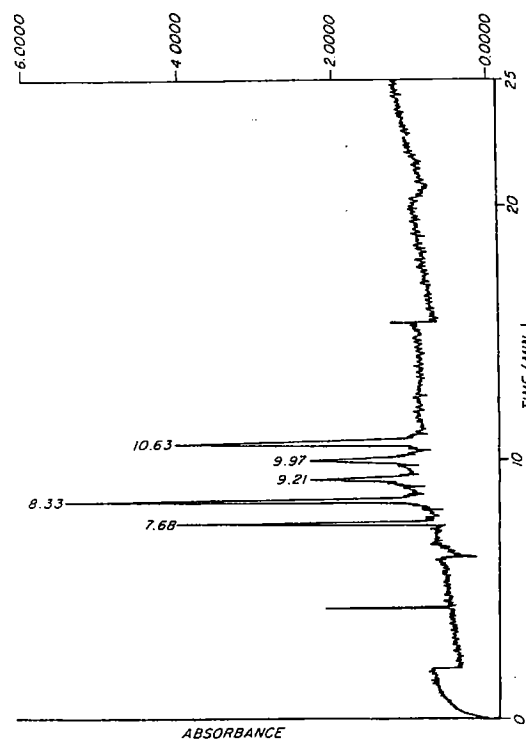
**FIG. 4**



**FIG. 5**

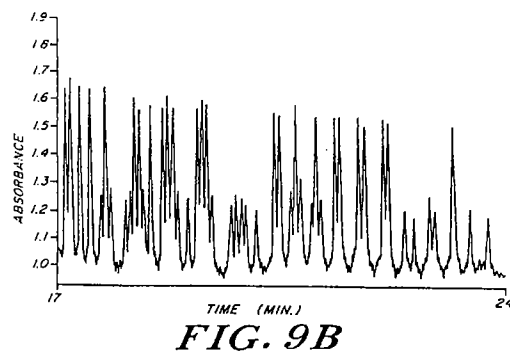
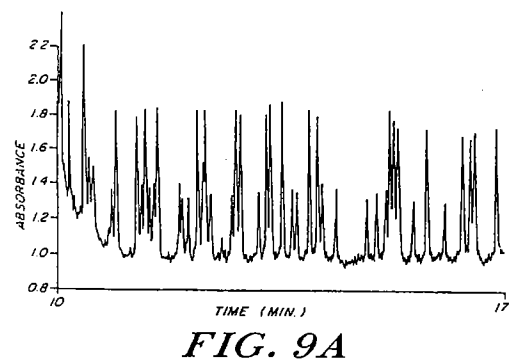
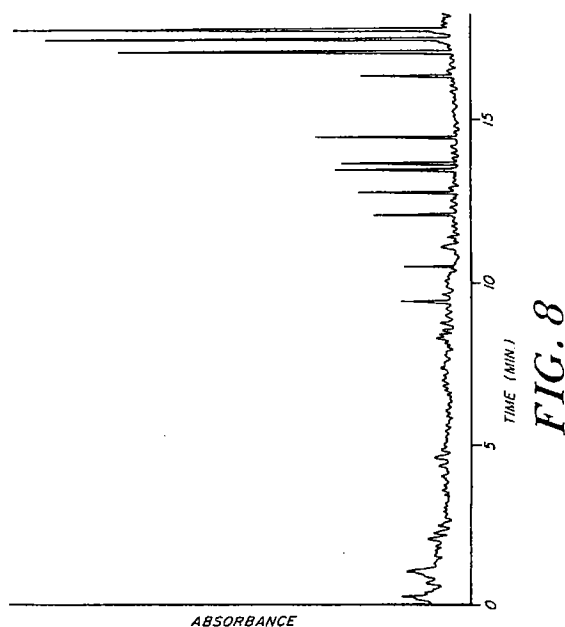


**FIG. 6**



**FIG. 7**





国際調査報告		International application No. PCT/US 93/12513
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 G01N27/447		
According to International Patent Classification (IPC) to be used national classification and IPC		
2. FIELD OF THE INVENTION IPC 5 G01N		
Maximum number of words (classification symbols) (indicated by classification symbols)		
3. SUMMARY OF THE INVENTION (The invention is described in the claims and the description and the drawings are included in the field of the invention)		
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS (The drawings are included in the field of the invention)		
5. REFERENCES CITED TO THE INVENTION		
Category *	Class of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
A	US, A, 5 110 439 (R. R. HOLLOWAY) 5 May 1992 cited in the application see abstract	1
A	JOURNAL OF MICROCOLUMN SEPARATIONS vol. 4, no. 2, 30 April 1992 pages 135 - 143 NINGJIAN HUANG 'EVALUATION OF SURFACE-BONDED POLYETHYLENE GLYCOL AND POLYETHYLENE IMINE IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS' cited in the application see abstract	1
A	US, A, 4 276 061 (T. J. NESTRICK) 30 June 1981 see abstract	1
6. STATE OF THE ART <input checked="" type="checkbox"/> Under documents are listed in the description of the art. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
7. OTHER INFORMATION (a) documents defining the general state of the art which is not considered as prior art or reference (b) other documents not published on or after the international filing date (c) documents which may be relevant to the prior art of the invention but which are not published on or after the international filing date (d) documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means (e) documents published prior to the international filing date but after the priority date		
Date of the actual completion of the international search: 31 March 1994		
Date of mailing of the international search report: 05.05.94		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1318, 6000 Luxembourg Tel.: (31) 71 50 50 50, Telex: 31 431 rpe m, Fax: (31) 71 50 50 50		
Address of the applicant Duchetellier, M		

Form PCT/ISA, 20 (revision 09/93)

国際調査報告		International application No. PCT/US 93/12513
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 G01N27/447		
According to International Patent Classification (IPC) to be used national classification and IPC		
2. FIELD OF THE INVENTION IPC 5 G01N		
Maximum number of words (classification symbols) (indicated by classification symbols)		
3. SUMMARY OF THE INVENTION (The invention is described in the claims and the description and the drawings are included in the field of the invention)		
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS (The drawings are included in the field of the invention)		
5. REFERENCES CITED TO THE INVENTION		
Category *	Class of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
A	DE, A, 30 05 024 (E. BAYER) 20 August 1981 see claim 1	1
A	US, A, 4 690 749 (J. M. VAN ALSTINE) 1 September 1987 see column 10, line 7 - line 13	1
A	EP, A, 0 417 925 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 20 March 1991 see page 5, line 25 - line 35	1
6. STATE OF THE ART <input checked="" type="checkbox"/> Under documents are listed in the description of the art. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
7. OTHER INFORMATION (a) documents defining the general state of the art which is not considered as prior art or reference (b) other documents not published on or after the international filing date (c) documents which may be relevant to the prior art of the invention but which are not published on or after the international filing date (d) documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means (e) documents published prior to the international filing date but after the priority date		
Date of the actual completion of the international search: 31 March 1994		
Date of mailing of the international search report: 05.05.94		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1318, 6000 Luxembourg Tel.: (31) 71 50 50 50, Telex: 31 431 rpe m, Fax: (31) 71 50 50 50		
Address of the applicant Duchetellier, M		

Form PCT/ISA, 20 (revision 09/93)

国際調査報告			
Patent document number or serial / symbol		International application No. PCT/US 93/12513	
Publication date	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5110439	05-05-92	EP-A- 0529899	03-03-93
US-A-4276061	30-06-81	US-A- 4242227	30-12-80
DE-A-3005024	20-08-81	EP-A, B 0034326	26-08-81
		US-A- 4387206	07-06-83
US-A-4690749	01-09-87	NONE	
EP-A-0417925	20-03-91	US-A- 4997537	05-03-91
		US-A- 5112460	12-05-92
		CA-A- 2025052	13-03-91
		JP-A- 3163353	15-07-91

Form PCT ISA (218 question) (patent family study) (July 1997)

フロントページの続き

(72)発明者 フォレット, フランチェスク  
 アメリカ合衆国 02148 マサチューセツ  
 ツ州 マルデン ナンバー 40 ハイラン  
 ド アベニュー 525